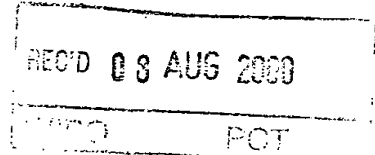


BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND5/10
88

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

DE 00 / 927
4**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung****Aktenzeichen:** 199 13 707.2**Anmeldetag:** 26. März 1999**Anmelder/Inhaber:** Privates Institut Bioserv GmbH, Rostock/DE**Bezeichnung:** Immunadsorber zur Sepsistherapie**IPC:** A 61 K, C 07 K

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 26. Juni 2000
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Hoß



Anmelder: Privates Institut Bioserv GmbH, Dr.-Lorenz-Weg 1, 18059 Rostock

Erfinder: H.-W. Heinrich, H.-J. Hahn, U. Meyer, P. Kruschke, H.-J. Wagner.

Immunadsorber zur Sepsistherapie

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft Immunadsorber zur Sepsistherapie, insbesondere zur Entfernung von Komplementfaktoren und Lipopolysacchariden (LPS) sowie ggf. von weiteren Sepsis-Mediatoren, wie z.B. TNF und Interleukinen aus Körperflüssigkeiten, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung.

Immunadsorber zur Sepsistherapie

Die Erfindung betrifft Immunadsorber zur Sepsistherapie, insbesondere zur Entfernung von Komplementfaktoren und Lipopolysacchariden (LPS) sowie ggf. von TNF und Interleukinen aus Körperflüssigkeiten, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung.

Jährlich erkranken in den USA, Japan und der EU ca. 3.5 Mill. Patienten an Sepsis. Bei einer Gesamteinwohnerzahl von 785 Mill. liegt die Inzidenz für diese Länder unter 0,5%. Wenn jedoch hospitalisierte Patienten hinsichtlich der Erkrankungshäufigkeit untersucht werden, wurden $2,0 \pm 0,16$ Sepsisfälle pro 100 Krankenhausaufnahmen nachgewiesen. Die enorme gesundheitspolitische und individuelle Bedeutung ergibt sich aus der Beobachtung, daß ca. 25 % dieser Patienten auch bei intensivster medizinischer Betreuung durch hochqualifizierte Spezialisten in modern ausgerüsteten Einrichtungen (Intensivstationen) das Syndrom des septischen Schocks erleiden, das durch eine Letalitätsrate von >45% charakterisiert ist.

Insbesondere bei polytraumatisierten Patienten (Verkehrsunfälle, Verbrennung, schwere Operationen) ist das Erkrankungsrisiko für den septischen Schock sehr hoch. Neben der Infektion von außen ist das Durchbrechen der Darmbarriere für normalerweise im Darm vorkommende gram-negative Bakterien infolge eines partiellen Funktionsverlustes des Immunsystems dieser Patienten und somit eine Infektion von „innen“ nachzuweisen.

In mehr als 50% der Erkrankungen lösen gram-negative Bakterien bzw. deren Zellwandbestandteile, die Endotoxine (Lipopolysaccharide, LPS), den septischen Schock aus. Das von den Bakterien freigesetzte LPS bindet sich an ein Serumprotein (LBP), um danach von den LPS-Rezeptoren der Monozyten/Makrophagen (CD14) aufgenommen zu werden. Die so aktivierten CD14+ Zellen produzieren Zytokine ($\text{TNF}\alpha$, Interleukin-1 (IL-1), IL-6, IL-8), die via Zytokin-Rezeptor der Zielzelle ihre Wirkung ausüben.

Parallel zur Stimulierung der Monozyten und Makrophagen wird das Komplementsystem aktiviert. Es ist ein integrierter Bestandteil der immunologischen Abwehr der Säugetiere zur unmittelbaren und unspezifischen Bekämpfung

bakterieller Mikroorganismen und Fremdpartikel. Von den im Bluts Serum vorkommenden Komplementproteinen, vorrangig Proenzym, die durch proteolytische Spaltung aktiviert werden, besitzt das C3-Protein mit einer Serumkonzentration von ca. 1g/l eine zentrale Rolle. Nach Kontakt der Mikroorganismen mit dem C3 wird das Komplementprotein C3a abgespalten und durch das entstehende C3b wird einerseits die Bildung der C5-Konvertase eingeleitet (alternativer Weg der Komplementaktivierung) und andererseits die Reaktion dadurch amplifiziert, indem das C3b durch Anlagerung von Serumfaktoren sich zur C3-Konvertase wandelt. Das ebenfalls im Serum vorkommende Komplementprotein C5 wird durch die nun verstärkt bereitgestellte C5-Konvertase proteolytisch unter Bildung von C5a gespalten. An das entstandene C5b lagern sich weitere Komplementproteine (C6-C9) an, bis schlußendlich der polymere hydrophobe Membranangriffskomplex (MAK) gebildet wurde, der sich in die Bakterienmembran (Opsonidierung) einlagert und Poren bildet, die zur Phagozytose und damit zur Elimination der Mikroorganismen (und des gebundenen MAK) führen. Die im Prozeß der Komplementaktivierung freigesetzten Komplementfaktoren C3a und C5a (Anaphylatoxine) bewirken durch eine Erhöhung der Gefäßpermeabilität und durch die durch sie induzierte Freisetzung von Chemotoxinen das Anlocken der phagozytierenden Zellen an den Ort des bakteriellen Befalls. Die Verringerung der Anzahl an Bakterien bewirkt die Verminderung der Aktivierung des Komplementsystems. Diese unmittelbare und unspezifische Reaktion ist mit den anderen immunologischen Abwehrsystemen insofern eng verwoben, indem beispielsweise durch Komplementfaktoren die Synthese und Freisetzung der für die zelluläre Abwehr essentiellen Zytokine reguliert wird. Um die inflammatorische Wirkung zu vermitteln, werden C3a und C5a an spezifische zellständige Rezeptoren gebunden, die wiederum in Abhängigkeit von der Immunreaktivität unterschiedlich stark exprimiert werden. Um die Immunabwehr permanent reaktionsbereit zu erhalten, sind aktivierte Komplementfaktoren nicht nur nach Befall mit Mikroorganismen nachweisbar, sondern integrierter Bestandteil des Serums von Normalpersonen in einer Konzentration von 1 - 10 ng/ml.

Insbesondere bei einer entwickelten Sepsis, bei akutem Lungenversagen und bei moribunden Patienten können die Plasmaspiegel der Anaphylatoxine mehr als tausendfach erhöht sein.

Fast ausschließlich auf der Basis von in vitro-Untersuchungen existieren unterschiedlichste meistens unspezifisch wirkende Lösungsvarianten, um die Wirkungen verschiedener Komplementfaktoren zu eliminieren, die aber wegen der zu erwartenden Nebenwirkungen kaum unter in vivo Bedingungen getestet werden können (z.B. WO-A-98/34959).

In ex vivo Verfahren zur Prävention der Komplementaktivierung durch künstlich, extrakorporale Oberflächen (z.B. Oberflächenbeschichtung n) wurde eine unspezifische Komplementinaktivierung erfolgreich durchgeführt. Desweiteren ist aus US 5,853,722 die selektive Entfernung aktivierter Komplementfaktoren unter Nutzung von spezifischen C5 Antikörpern bekannt und sicher auch zu bevorzugen, zumal hochaffine Antikörper zwischenzeitlich gegen alle Komponenten des Komplementsystems generiert wurden.

Die aufgezeigte funktionelle Kaskade dient vornehmlich der Eliminierung der in den Organismus eingedrungenen Bakterien. Sobald jedoch eine Diskrepanz zwischen der Anzahl und/oder Virulenz der eingedrungenen Bakterien und der Eliminierungskapazität des Immunsystems (z.B. beim posttraumatischen Immundefizit) auftritt, wird eine überschießende Aktivierung beobachtet, die nachfolgend von einer massenhaften Freisetzung von „Schockmediatoren“ (Interleukine, Thrombozytenaktivierungsfaktor (PAF), aber auch Sauerstoffradikale, Prostaglandine und deren Stoffwechselprodukte) begleitet wird, die die Eliminierungskapazität für LPS weiter einschränkt. Zusätzlich werden durch das LPS auch CD14-negative Zellen (z.B. Endothelien) aktiviert, da im Blutplasma lösliches CD14 (sCD14) als LPS Fänger vorhanden ist, das die Bindung an diese Zellen erleichtert und die Bildung und Freisetzung weiterer Schockmediatoren induziert, die dadurch den Circulus vitiosus verstärken. Da die Schockmediatoren zwar selektiv, aber nicht spezifisch wirken, werden Funktionseinschränkungen in verschiedenen Zellen und Organen beobachtet (Blutgerinnungssystem, Kreislauf, Komplement-System), so daß die den gesamten Organismus befallenden Entzündungsreaktionen die Schockgenese einleiten, die zu irreversiblen Organschäden, zum Kreislaufzusammenbruch und zum Tod führen.

Um diese Funktionskette zu durchbrechen sind unterschiedliche Therapiestrategien untersucht worden.

Die Unterbrechung der Kaskade mit Antikörpern, die die LPS-Bindung an Proteine (LBP, sCD14), an den Rezeptor (CD14), an freigesetzte Zytokine oder an Zytokinrezeptoren unterbrechen bzw. mit Antagonisten, die die funktionellen Bereiche der Rezeptoren blockieren, erbrachten an verschiedenen tierexperimentellen Sepsismodellen zwar beeindruckende Erfolge, jedoch bis heute liegen keine klinisch erprobten, erfolgreichen Präventions- und/oder Therapiestudien vor.

Die hochgesteckten Erwartungen konnten einerseits deshalb nicht erfüllt werden, da zunehmend erkannt werden mußte, daß LPS auch Zellen und Gewebe beeinflußt

und in ihrem Funktionszustand verändert, die durch diese Therapieansätze nicht beeinträchtigt werden. Außerdem muß berücksichtigt werden, daß ein durch einen Antikörper/Antagonisten inaktiviertes LPS (Immunkomplex) eliminiert werden muß, um eine biologische Reaktivität permanent auszuschließen. Die Eliminierung ist aber auch eine Funktion des Immunsystems, das, da stark geschwächt, dieser Aufgabe kaum oder nur sehr unvollkommen nachkommen kann.

Die Entwicklung des septischen Schocks ist ein sehr dynamisches Geschehen primär unterschiedlicher Genese, bei dem innerhalb kurzer Zeit unterschiedliche Mediatoren sehr verschiedene Reaktionen bewirken, die nach anfänglich lebenserhaltender Funktion rasch durch Fehlregulation zur Ausprägung des septischen Schocks führen.

Der Erfindung lag deshalb die Aufgabe zugrunde, ein modular aufgebautes Immunadsorptionssystem insbesondere für die extrakorporale Detoxifikation zu entwickeln, das es ermöglicht, patientenspezifisch Plasma- und Gewebespiegel zu reduzieren.

Die Erfindung beruht unter anderem auf der Erkenntnis, daß $\text{TNF}\alpha$ eine Schlüsselstellung in diesem Regulationssystem einnimmt. Es wird durch unterschiedlichste „äußere“ Einflüsse, wie z.B. Verletzungen, Entzündungen, Infektionen, Septikämie u.a. von Makrophagen freigesetzt und induziert über eine Zytokinkaskade (IL-1, IL-6) eine lokale und systemische Aktivierung des unspezifischen und spezifischen Abwehrsystems. Klinisch äußert sich eine massive $\text{TNF}\alpha$ -Freisetzung in erhöhter Körpertemperatur, Inappetenz und allen Folgesymptomen einer katabolischen Stoffwechsellage. In der Pathogenese der Sepsis scheint in der frühen Phase dieser Erkrankung die Aktivierung der Makrophagen und damit die $\text{TNF}\alpha$ -Freisetzung für das Überleben des Patienten von essentieller Bedeutung zu sein, während im weiteren Verlauf der anhaltende Aktivierungszustand die Dekompensation aller Abwehrreaktionen nach sich zieht.

Die Aufgabe der Erfindung wurde durch einen Immunadsorber zur Sepsistherapie gelöst. Insbesondere dient der erfindungsgemäße Immunadsorber zur Entfernung von Komplementfaktoren und Lipopolysacchariden (LPS) sowie ggf. zur Entfernung von weiteren Sepsis-Mediatoren, wie von TNF und Interleukinen aus Körperflüssigkeiten. Er ist gekennzeichnet durch Trägermaterialien aus organischen oder synthetischen Polymeren, an die sowohl poly- oder monoklonale Antikörper gebunden sind, die gegen die Komplementfaktoren C3a und/oder C5a als auch Antikörper, die gegen Lipopolysaccharide (LPS) gerichtet sind. In einer bevorzugten

Ausführung sind auch Antikörper, die gegen weitere Sepsis-Mediatoren gerichtet sind, an die Träger gebunden.

Bevorzugt handelt es sich um polyklonale Antikörper besonders bevorzugt um aviäre Antikörper des Typs IgY. Die Antikörper gegen Sepsis-Mediatoren sind entsprechend des Zustandes der Dysregulation enthalten.

Gemäß der Erfindung handelt es sich dabei um Antikörper, die gegen TNF, IL1, IL6, IL8 und/oder IL10 gerichtet sind.

Bevorzugte Antikörper gegen den Komplementfaktor C3a weisen mindestens eine der folgenden Peptidsequenzen auf:

NH₂-KCCEDGMRQNPMR-COOH

NH₂-RFSCQRRTRFISL-COOH

NH₂-ITELRRQHARAS-COOH

Bevorzugte Antikörper gegen den Komplementfaktor C5a besitzen mindestens eine der folgenden Peptidsequenzen:

NH₂-QADYKDDDDKLP AE-COOH

NH₂-DDKLPAEGLDIENS-COOH

Bevorzugte Antikörper gegen IL10 besitzen mindestens einer der folgende Peptidsequenzen

NH₂-SPGQGTQSENSCT-COOH

NH₂-QMKDQLDNLLLKES-CCOH

NH₂-MPQAENQDPDIKA-COOH

NH₂-LPCENKSKAVEQ-COOH

Der erfindungsgemäße Immunadsorber weist als Trägermaterialien an sich übliche Membranen oder Partikel aus organischen oder synthetischen Polymeren auf, so z.B. aus Polystyrolen, Kohlenhydraten, wie z.B. Zellulose- oder Agarosederivate oder aus Acrylaten, wobei die spezifischen Antikörper kovalent an diese gebunden oder über Spacer oder Linker an sie fixiert sind.

Die Herstellung der erfindungsgemäßen Immunadsorber erfolgt durch an sich bekannte Methoden, indem die Antikörper, die gegen C3a und/oder C5a und LPS sowie ggf. gegen weitere Sepsis-Mediatoren gerichtet sind, kovalent oder adsorptiv

an die Trägermaterialien aus organischen oder synthetischen Polymeren gekoppelt werden.

Die spezifischen Antikörper werden durch an sich bekannte Immunisierung vorzugsweise von Kleinsäugetieren, wie Mäusen, Ratten oder Kaninchen oder Vögeln, wie z.B. Hühnern, mit den entsprechenden Antigenen hergestellt.

Gegenstand der Erfindung ist auch die Verwendung der Immunadsorber in Vorrichtungen zur Entfernung von Komplementfaktoren, LPS und ggf. von weiteren Mediatoren aus Körperflüssigkeiten, wie Blutplasma, in Abhängigkeit der patientenspezifischen Situation

Bevorzugt werden die Immunadsorber in der Sepsistherapie für die Plasmaapherese bei Patienten mit Sepsis oder septischem Schock eingesetzt.

Obwohl für die meisten Substanzen Antikörper verfügbar sind, die nach bekannten Methoden an die unterschiedlichen Träger gekoppelt werden können, werden bevorzugt aviäre Antikörper verwendet, da diese, im Gegensatz zu Säuger-Antikörpern das Komplementsystem nicht aktivieren. Da die aktivierenden Eigenschaften an den F_c-Teil der Säuger-Antikörper gebunden sind, kann prinzipiell auch das mit Papain abgespaltene F_{ab}-Fragment verwendet werden.

Nach derzeitigem Kenntnisstand haben immobilisierte aviäre Antikörper keinerlei unspezifische Wirkungen auf das Abwehrsystem des Menschen. Vögel, vorzugsweise Hühner werden mit üblichen Verfahren ohne oder mit Verwendung von Adjuvantien immunisiert. Die spezifischen Immunglobuline werden im Eidotter ausgeschieden und können hieraus mit üblichen Methoden isoliert werden. Sie werden mit bekannten Verfahren kovalent am F_c-Teil an Mikropartikel oder Membranen gebunden.

Mit dem erfindungsgemäßen Immunadsorptionssystem für die extrakorporale Detoxifikation steht erstmals ein selektives System zur Verfügung, welches patientenspezifisch einsetzbar ist und durch das Fehlregulationen des Immunsystems behoben werden können.

Patentansprüche

1. Immunadsorber zur Sepsistherapie gekennzeichnet durch Trägermaterialien aus organischen oder synthetischen Polymeren mit gebundenen poly- oder monoklonalen Antikörpern, die gegen die Komplementfaktoren C3a und/oder C5a und gegen Lipopolysaccharide (LPS) sowie ggf. mit Antikörpern, die gegen weitere Sepsis-Mediatoren gerichtet sind.
2. Immunadsorber nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Antikörper polyklonale Antikörper sind.
3. Immunadsorber nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Antikörper aviäre Antikörper des Typs IgY sind.
4. Immunadsorber nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß weitere Antikörper gegen Sepsis-Mediatoren entsprechend des Zustandes der Dysregulation enthalten sind.
5. Immunadsorber nach Anspruch 1 und 4, dadurch gekennzeichnet, daß diese Antikörper gegen TNF, IL1, IL6, IL8 und/oder IL10 gerichtet sind.
6. Immunadsorber nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die gebundenen Antikörper gegen mindestens eine der folgenden Peptidsequenzen der Komplementfaktoren C3a und C5a

C3a: NH₂-KCCEDGMRQNPMR-COOH
 NH₂-RFSCQRRTRFISL-COOH
 NH₂-ITELRRQHARAS-COOH

C5a: NH₂-QADYKDDDDKLPAE-COOH
 NH₂-DDKLPAEGLDIENS-COOH

gerichtet sind.

7. Immunadsorber nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Antikörper gegen mindestens eine der folgende Peptidsequenzen

IL10: NH₂-SPGQGTQSENSCT-COOH
 NH₂-QMKDQLDNLLKES-CCOH

NH₂-MPQAENQDPDIKA-COOH

NH₂-LPCENKSKAVEQ-COOH

gerichtet sind.

8. Immunadsorber nach den Ansprüchen 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß das organische oder synthetische Trägermaterial aus Membranen oder Partikeln aus Polystyrolen, Kohlenhydraten, wie Zellulose- oder Agarosederivaten, oder Acrylaten besteht.
9. Immunadsorber nach den Ansprüchen 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die spezifischen Antikörper kovalent an die Membranen oder Partikel gebunden sind.
10. Immunadsorber nach den Ansprüchen 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Antikörper über Spacer oder Linker an die Trägermaterialien fixiert sind.
11. Verfahren zur Herstellung von Immunadsorbern gemäß Anspruch 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß an Trägermaterialien aus organischen oder synthetischen Polymeren Antikörper, die gegen C3a und/oder C5a und LPS sowie ggf. gegen weitere Sepsis-Mediatoren gerichtet sind, kovalent oder adsorptiv gekoppelt werden.
12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Antikörper durch Immunisierung vorzugsweise von Kleinsäugern, wie Mäusen, Ratten oder Kaninchen, oder Vögeln, wie Hühnern, mit den entsprechenden Antigenen hergestellt werden.
13. Verwendung von Immunadsorbern gemäß Anspruch 1 bis 10 als wirksamer Bestandteil einer Vorrichtung zur Entfernung von Komplementfaktoren, LPS und ggf. weiteren Mediatoren in patientenspezifischer Kombination aus Körperflüssigkeiten.
14. Verwendung nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß die Immunadsorber für die Plasmaapherese bei Patienten mit Sepsis oder septischem Schock eingesetzt werden.